

2015 年度 修士論文要旨

分裂酵母 MCM 結合タンパク質 Mcb1 の精製, 結晶化及び物理化学的特性

関西学院大学大学院理工学研究科

化学専攻 山口研究室 中村 修士

【序論】真核生物において、MCM(Mini-chromosome maintenance)は、Mcm2~7 サブユニットからなる 6 量体を形成しており MCM 複合体と呼ばれる。この複合体はヘリカーゼ活性を有し、複製フォークの安定化に関与する等、DNA 複製に必要不可欠である。この MCM 複合体の結合因子である MCM-BP(MCM binding protein)がヒト細胞で同定され、分裂酵母でもそのオルソログとして Mcb1(MCM binding protein 1)が同定された。Mcb1 は細胞周期を通して恒常的、且つ豊富に存在しているタンパク質で、細胞質・核質・クロマチン上に広く分布している。さらに Mcb1 を過剰発現させると、Mcm2 と他の MCM タンパク質複合体の結合が解離し、その結果 DNA 複製の阻害、DNA 損傷、チェックポイントキナーゼ Chk1 の活性が引き起こされる等、Mcb1 は MCM ヘリカーゼの機能と拮抗して働くことが知られている。しかし、Mcb1 の未解明な点として、Mcb1 と MCM との相互作用様式等が挙げられる。そこで、Mcb1 の構造を明らかにし、構造学的視点から機能解明に繋げる事を目標とし、構造解析に着手した。そのためには結晶化が必須であり、本研究では Mcb1 の高純度試料の調製方法の確立と、CD スペクトル測定を用いた pH、尿素濃度、温度変化による立体構造変化の検討、それを踏まえた結晶化条件検討を試みた。

【実験・結果】N 末に His タグを結合させた Mcb1 を大腸菌発現系を用い大量発現させた。集菌、超音波破碎をした後、Ni-キレートアフィニティークロマトグラフィーによる粗精製を行った。Ni 樹脂に吸着後、イミダゾール 100, 250 mM を含んだ緩衝液で順次目的タンパク質の溶出を試みた。溶出で得られた各試料は SDS-PAGE で純度を検定した。その結果、Mcb1 が効率的に溶出できることが認められた。100, 250 mM の溶出で得られた試料は混合した後に限外濾過による

濃縮を行った。さらに、純度を高めるためゲル濾過クロマトグラフィーを行った。ゲル濾過クロマトグラフィーで得られた試料で SDS-PAGE による純度検定を行ったところ、不純物らしきバンドは見られず、Mcb1 が高純度に精製されたことを示した。また、動的光散乱法 (DLS) による溶液中多分散度測定を行った。測定の結果、指標となる多分散指数(PDI:Polydispersity index) は 0.084 となり、結晶化に適した標品だと判断できる PDI 値 0.02 に近い値を得られた。この結果より、単分散に近い標品であることが分かり、結晶化条件の検討を行うと結晶が晶出する可能性が示唆された。次に、この標品における物理化学的特性を調べるために、数々の条件下で遠紫外円偏光(CD)スペクトル測定を行った。まず、Mcb1 の熱力学的安定性を調べるために、尿素濃度変化 (2 M, 3 M, 3.5 M, 4 M, 5 M, 6 M, 8 M) と温度変化 (20-80 °C) による立体構造の変化を検討し、それぞれ曲線を作製した。尿素濃度依存曲線において、2 状態転移と仮定した場合、尿素による変性中点は 3.50 M、 ΔG は 1.27 kcal/mol であることが分かった。同様に、温度に関する熱変性曲線において、変性中点は 42 °C であった。また、20 °C における ΔG は 2.40 kcal/mol であることが分かった。次に、結晶化条件の検討を行う際に最適な pH を調べるため、pH 変化 (6, 7, 8, 9, 10) によるそれぞれの Mcb1 立体構造変化を検討した。測定の結果、 α ヘリックス含量を示す波長 (222 nm) の CD 値が pH 8 の場合は最も負の極大を示す事が分かり、結晶化条件検討の際には、pH 8 で検討することが最適であると分かった。次に、標品を用いて結晶化条件の検討を行った。10-20 mg/ml まで濃縮した標品 (50 mM Tris/HCl(pH 8.0), 10 % Glycerol, 300 mM NaCl) を用いて、スパースマトリックス法による結晶化条件のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、数条件で微結晶らしきものが観察されたが、紫外光を当てるとタンパク質結晶でない可能性が高いことが示唆された。タンパク質が結晶化しない原因として、このタンパク質が核酸等に非特異的に結合しているために構造が均一な状態ではないことが考えられる。今後、問題点を考慮し、リフォールディングによる非特異的結合物除去や、ATP を加えることにより均一性を保つ等の検討を行うことで、良質な Mcb1 の結晶が得られると考えている。結晶が得られれば、Mcb1 の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、機能解明につなげる。